

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.053

TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN PROTEIN DUNG HỢP LTb-STb CỦA ENTEROTOXIGENIC *Escherichia coli* GÂY TIÊU CHẢY TRÊN HEO CON

Huỳnh Thị Xuân Mai, Huỳnh Kiến Quang, Nguyễn Đăng Thanh Hào và Trần Văn Hiếu*

Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Văn Hiếu (email: tvhieu@hcmus.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 18/12/2019

Ngày nhận bài sửa: 03/04/2020

Ngày duyệt đăng: 29/06/2020

Title:

Cloning and expression of recombinant protein LTb-STb from enterotoxigenic *Escherichia coli* causing neonatal pig diarrhea

Từ khóa:

Độc tố ST, ETEC, heo con, tiêu chảy, vaccine tái tổ hợp

Keywords:

Diarrhea, ETEC, neonatal pig, recombinant vaccine, ST enterotoxin

ABSTRACT

Diarrhea caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) causes weight loss, slow growth or death, leading to economic losses. Currently, there is no effective vaccine to prevent ETEC. Toxoid vaccines are based on the most common ETEC enterotoxin - STb, which is poor immunogenicity. To solve the problem, STb was fused with B subunit of enterotoxin LT to enhance the immunogenicity of STb, and increase the spectrum of ETEC vaccine. In this study, gene *estB* (encoding for STb) and plasmid pET28a-*eltB* were treated simultaneously with HindIII and XhoI, after that, were ligated by T4 ligase to form pET28a-*eltB-estB* then were confirm by DNA sequencing. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strain and evaluated the protein expression by, SDS - PAGE and Western blot with 6xHis probe. In result, LTb-STb was successfully cloned and expressed in inclusion bodies, create a source for further immunogenicity experiments.

TÓM TẮT

Bệnh tiêu chảy do Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) làm heo giảm trọng lượng, chậm lớn hoặc chết, gây nhiều thiệt hại kinh tế nhưng vẫn chưa có vaccine phòng ngừa. Vaccine giải độc tố phổ biến nhất dựa trên tiểu phần B của độc tố bền nhiệt (STb) nhưng lại sinh miễn dịch kém. Để giải quyết vấn đề, STb được dung hợp với tiểu phần B độc tố nhạy nhiệt (LTb) để tăng tính sinh miễn dịch cho STb và mở rộng phổ kháng. Trong nghiên cứu này, gene *estB* mã hóa STb và plasmid pET28a-*eltB* được xử lý với hai enzyme HindIII và XhoI, sau đó nối với nhau bằng T4 ligase để tạo plasmid pET28a-*eltB-estB*. Plasmid tái tổ hợp sau khi xác nhận bằng giải trình tự được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 (DE3) và được kiểm tra sự biểu hiện protein bằng phương pháp SDS - PAGE và Western blot với kháng thể anti-6xHis. Kết quả, gene mã hóa độc tố đường ruột LTb-STb đã được tạo dòng và biểu hiện thành công ở dạng thể vùi, làm nguyên liệu cho các thử nghiệm tính sinh miễn dịch của protein dung hợp này.

Trích dẫn: Huỳnh Thị Xuân Mai, Huỳnh Kiến Quang, Nguyễn Đăng Thanh Hào và Trần Văn Hiếu, 2020. Tạo dòng và biểu hiện protein dung hợp LTb-STb của Enterotoxigenic *Escherichia coli* gây tiêu chảy trên heo con. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(3B): 53-59.

1 MỞ ĐẦU

Bệnh tiêu chảy là bệnh phổ biến trên heo con, xảy ra chủ yếu ở giai đoạn heo con theo mẹ và heo con sau cai sữa. Heo tiêu chảy bị mất nước, mất chất điện giải, hấp thụ dinh dưỡng kém, tạo điều kiện cho vi sinh vật cơ hội xâm nhập và phát triển. Heo con khi bị tiêu chảy có thể giảm từ 10-12% khối lượng cơ thể trong thời gian chưa tới 6 giờ và có thể dẫn tới chết. Ngay cả khi sống sót sự tăng trưởng của heo con cũng có thể bị chậm lại (Holland, 1990; Lâm Thị Thu Hương và Đường Chi Mai, 2011). Vi sinh vật là nguyên nhân chính gây bệnh tiêu chảy, trong đó Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây bệnh tiêu chảy trên heo con (Morin *et al.*, 1983; Holland, 1990; Wieler *et al.*, 2001; Katsuda *et al.*, 2006). Tại Việt Nam, nghiên cứu của Lý Thị Liên Khai và *ctv.* vào năm 2015 về heo con bị tiêu chảy tại tỉnh Đồng Tháp và Vĩnh Long cho thấy ETEC cũng là nguyên nhân chính, chiếm tỷ lệ lần lượt là 92,23% và 94,39%. Nguyên nhân có thể là do các chủng ETEC này kháng nhiều loại kháng sinh như: ampicillin, bactrim, tetracycline (Lý Thị Liên Khai và *ctv.*, 2015). Hướng đến mục tiêu loại bỏ kháng sinh khỏi các sản phẩm chăn nuôi, việc phát triển vaccine phòng ngừa tiêu chảy do ETEC gây ra là cần thiết. Thế nhưng, một số vaccine phòng ETEC cho heo con sử dụng hiện nay vẫn chưa mang lại hiệu quả như mong đợi. Các vaccine này chỉ tập trung vào một số loại nhân tố bám dính nhất định nên không thể bảo vệ heo con khỏi các chủng ETEC mang các nhân tố bám dính khác (Nguyễn Thị Hạnh Chi và *ctv.*, 2014). Điều này cho thấy khó khăn khi phát triển vaccine phòng ETEC dựa trên nhân tố bám dính. Trong khi đó, độc tố do ETEC tiết ra tập trung thành hai nhóm lớn: độc tố nhạy nhiệt (heat-labile enterotoxin - LT) và độc tố bền nhiệt (heat-stable enterotoxin - ST) chính là nguyên nhân trực tiếp dẫn đến tiêu chảy. Vậy nên hướng phát triển vaccine phòng ETEC dựa trên độc tố đang được quan tâm. Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Hạnh Chi và *ctv.* (2014), STb là độc tố phổ biến nhất trong nhóm các độc tố, các chủng mang STb chiếm tỷ lệ 33,33%. Độc tố STb (hay STII) là một peptide có 48 amino acid, khối lượng khoảng 5 kDa. Thụ thể ở tế bào biểu mô ruột mà STb gắn vào được xác định là sulfatide (3' sulfogalactosyl ceramide). STb không làm tăng cGMP hay cAMP trong tế bào biểu mô ruột. Sự gắn vào thụ thể của STb dẫn tới việc tăng hấp thụ ion Ca^{2+} vào trong tế bào. Điều này làm hoạt hóa protein kinase C dẫn tới hoạt hóa CFTR. Đây là một kênh ion, việc hoạt hóa kênh này làm tăng tiết các ion Cl^- và HCO_3^- , đồng thời làm giảm sự hấp thụ

Na^+ , dẫn nước từ trong tế bào thấm thấu ra ngoài lòng ruột và kết quả là dẫn đến tiêu chảy (Gyles *et al.*, 2011). Ngoài ra, mức độ Ca^{2+} cao trong tế bào còn điều hòa hoạt động của phospholipase A2, C và giải phóng arachidonic acid từ màng phospholipid, dẫn tới hình thành prostaglandin E2 (PGE2) và 5 hydroxytryptamine (5-HT), chuyển nước và các chất điện giải ra khỏi tế bào (Dubreuil *et al.*, 2008). Vậy nên phát triển vaccine phòng ETEC dựa trên độc tố STb là hướng đi đúng đắn. Thế nhưng, khó khăn gặp phải là tính sinh miễn dịch kém của protein này (Dubreuil *et al.*, 1996). Để giải quyết vấn đề này, Dubreuil *et al.* (1996) đã dung hợp STb với maltose binding protein (MBP) làm tăng tính sinh miễn dịch của STb. Kết quả này gợi ý rằng STb có thể tăng được tính sinh miễn dịch khi được dung hợp với một protein thích hợp khác.

Bên cạnh đó, ETEC còn có một nhóm độc tố khác, chiếm tỷ lệ không nhỏ có tên là độc tố LT, trọng lượng phân tử từ 84-88 kDa (Dubreuil *et al.*, 2008). Đây là độc tố có tính hưng thần kinh và gây hoại tử. Độc tố LT cấu tạo từ một tiểu phần A (240 amino acid) và năm tiểu phần B (103 amino acid) (O'Brien and Holmes, 1996). Trong đó, tiểu phần A mang hoạt tính gây độc với hai chuỗi polypeptide A1 và A2. Hai chuỗi peptide này liên kết nhau bởi cầu nối disulfide giữa A1- amino acid Cystein (Cys) 187 và A2-Cys199. Còn các tiểu phần B liên kết với nhau tạo thành cấu trúc vòng nhẵn, bền vững và liên kết với tiểu phần A bằng liên kết không cộng hóa trị. Đồng thời, chuỗi A2 tạo thành cấu trúc cái móc liên kết không đồng hóa trị giữa tiểu đơn vị A và lỗ hổng giữa của vòng năm tiểu phần B (Fan *et al.*, 2004). Mỗi tiểu phân tử B (gọi tắt LTB) có một vị trí gắn với thụ thể tiếp nhận độc tố của tế bào vật chủ (O'Brien and Holmes, 1996). LTB không mang hoạt tính gây độc nhưng lại đóng vai trò quan trọng trong tương tác giữa LT và thụ thể của nó trên tế bào biểu mô ruột; mặt khác, LTB lại có tính sinh miễn dịch mạnh nên được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu về vắc xin phòng ETEC. Chính vì vậy, STb và LTB được tiến hành dung hợp để làm tăng tính sinh miễn dịch của STb, nhằm hướng đến việc phát triển vaccine phòng ngừa ETEC trên heo con, đồng thời, mở rộng phổ kháng của vaccine này.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Bộ gene, chủng vi sinh vật và môi trường

Chủng ETEC được cung cấp bởi Viện Thú y Trung ương. Chủng *E. coli* DH5 α [F- endA1 hsdR17 (rk-/mk-) supE44 thi λ -recA1 gyrA96 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15)] dùng để đồng hóa

plasmid; chủng *E. coli* BL21 (DE3) (F+ ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm(DE3)) để biểu hiện protein; chủng *E. coli* DH5α/pET28a-*eltB* để thu plasmid pET28a-*eltB*. Chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*eltB* với gen *eltB* thu từ genome của ETEC được dòng hóa vào plasmid pET28a, cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử Môi trường, Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG - HCM. Tất cả các chủng *E. coli* được nuôi cấy trên môi trường Luria broth – LB (Merck) ở 37°C với kháng sinh kanamycin (Sigma) nồng độ 50 µg/µL.

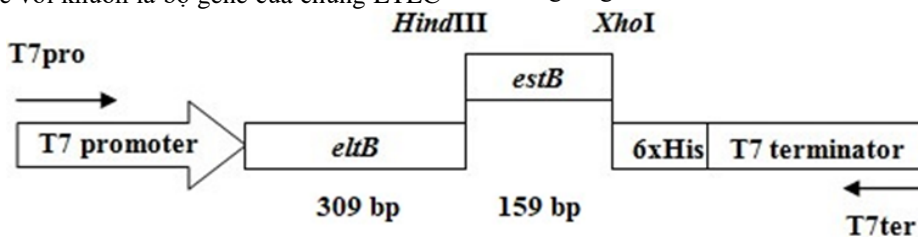
2.2 Cấu trúc plasmid pET28a-*eltB*-*estB*

Gene *estB* (mã hóa cho STb) được thu nhận thông qua phản ứng PCR bằng enzyme MyTaq polymerase với khuôn là bộ gene của chủng ETEC

với cặp mồi đặc hiệu có trình tự nhận biết của enzyme cắt giới hạn *Xho*I và *Hind*III với chu trình nhiệt được đề nghị theo nhà sản xuất của enzyme polymerase, cụ thể: chuẩn bị biến tính 95°C trong 3 phút, tiếp theo là 95°C trong 15 giây, 55°C trong 10 giây, 72°C trong 10 giây, lặp lại chu trình này trong 30 chu kỳ, tiếp đến là bước kéo dài cuối cùng 72°C trong 10 phút, kết thúc bằng bước giữ sản phẩm PCR trong 4°C. Trình tự mồi thu gene như sau:

estBF
HindIII: aagcttCAGTCAACTGAATCACTTGAC
estBR
XhoI: ctcgagATAACATCCAGCACAGGCAGG

Sau đó, sản phẩm PCR được tinh sạch thông qua bộ kit EZ-10 Spin Column và được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.



Hình 1: Sơ đồ chèn gene *estB* vào plasmid pET28a-*eltB*

Đồng thời, plamid pET28a-*eltB* được tiến hành thu nhận từ chủng *E. coli* DH5α/pET28a-*eltB* bằng phương pháp SDS - kiềm. Cả gene *estB* và plasmid pET28a-*eltB* đều được xử lý để tạo đầu dính tương hợp bằng enzyme cắt giới hạn *Xho*I và *Hind*III. Sau khi xử lý, plasmid và gene sau đó được nối với nhau bằng enzyme T4 ligase. Sản phẩm của phản ứng nối được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5α bằng phương pháp hóa biến nạp và trải trên môi trường LB chứa kháng sinh chọn lọc (kanamycin).

Các khuẩn lạc mọc trên môi trường kháng sinh được chọn một cách ngẫu nhiên và sàng lọc bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp mồi T7pro, T7ter. Trình tự T7pro và T7ter như sau:

T7 pro: TAATACGACTCACTATAGGG
T7 ter: GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Sản phẩm PCR sẽ được điện di trên gel agarose 1%. Plasmid được tách chiết từ các dòng cho kết quả PCR dương tính và giải trình tự nhằm khẳng định plasmid tái tổ hợp pET28a-*eltB*-*estB*.

2.3 Biểu hiện protein dung hợp LTB-STb bằng chất cảm ứng Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside

Plasmid pET28a-*eltB*-*estB* được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 (DE3) và trải trên môi trường

LB kanamycin. Các khuẩn lạc mọc được trên môi trường kháng sinh được lựa chọn ngẫu nhiên và sàng lọc bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với mồi T7pro và T7ter.

Các khuẩn lạc có kết quả PCR dương tính được hoạt hóa qua đêm (16 giờ) trong môi trường LB kanamycin. Tiếp theo, dịch sinh khối được cấy chuyển với tỷ lệ 1/20 (v/v). Tiến hành đo mật độ quang (OD) của dịch sinh khối, khi giá trị OD đạt giá trị trong khoảng 0,6 – 0,8 thì tiến hành cảm ứng với Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) với nồng độ 0,5 mM, lắc 250 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C trong 4 giờ. Sau đó tiến hành thu dịch sinh khối và phá tế bào bằng sóng siêu âm, thu protein ở các pha tổng, tan, tủa và kiểm tra sự biểu hiện vượt mức (vạch protein đậm hơn đối chứng nhiều lần) của LTB-STb bằng phương pháp SDS - PAGE với gel polyacrylamide 15%. Chủng *E. coli* BL21 (DE3) dùng để biểu hiện LTB được tiến hành theo quy trình tương tự để sử dụng làm mẫu đối chứng.

***Phương pháp SDS-PAGE:** là phương pháp kiểm tra sự biểu hiện của protein dựa trên sự khác biệt về kích thước. Khi đặt vào trong điện trường, các protein di chuyển từ cực âm về dương, các protein nhỏ hơn sẽ di chuyển xuyên qua mạng lưới gel acrylamide nhanh hơn. Các protein có cùng kích

thước sẽ di chuyển cùng tốc độ và tạo thành một vạch trên gel acrylamide.

***Quy trình kiểm tra biểu hiện bằng phương pháp SDS-PAGE:** Sinh khối (1 mL) được ly tâm 6.000 vòng/phút, trong năm phút, bỏ dịch nổi. Bổ sung 500 μ L H₂O, vortex đều, ly tâm 6.000 vòng/phút trong năm phút, bỏ dịch nổi. Bổ sung 300 μ L dung dịch ly giải, vortex đều. Phá tế bào bằng máy sonicate. Thu 100 μ L dịch (pha tổng). Ly tâm 13.000 vòng/phút, trong 15 phút, hút 100 μ L dịch nổi (pha tan); đổ bỏ dịch nổi còn lại. Thêm 300 μ L dH₂O, ly tâm 13.000 vòng/phút, trong 15 phút. Đổ bỏ dịch nổi, thêm 200 μ L dung dịch ly giải, vortex đều. Thu 100 μ L dung dịch sang ống 1,5 mL mới (pha tủa). Bổ sung 33 μ L dung dịch nạp mẫu 4X vào các pha, gia nhiệt 100°C trong 15 phút. Pha gel gom và gel tách. Nạp 10 μ L mẫu vào các giếng. Điện di với thông số: Cường độ dòng điện (cố định) I = 40 mA, hiệu điện thế U = 200 V, thời gian 1 giờ 45 phút. Nhuộm gel trong dung dịch nhuộm coomassive trong 45 phút. Chuyển gel sang dung dịch giải nhuộm, đặt trên máy lắc chờ trong hai giờ. Quan sát các vạch điện di.

2.4 Xác nhận sự biểu hiện protein LTB-STB

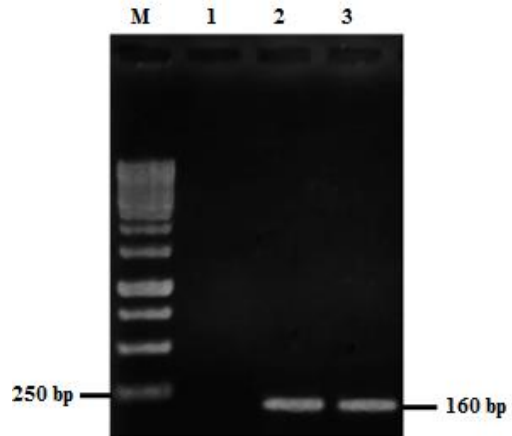
Để xác nhận sự biểu hiện, protein LTB-STB được tiến hành lai theo phương pháp Western blot. Cụ thể, các protein được chuyển thấm lên trên màng nitrocellulose, sau đó, màng lai được ủ với kháng thể anti-His (Santa Cruz) với tỷ lệ 1/1.000, qua đêm ở 4°C. Tiếp đến, màng lai được tiếp tục ủ với kháng thể anti-IgG (Santa Cruz) có gắn HRP với tỷ lệ 1/10.000 trong 2 giờ ở 25°C. Sau khi màng được rửa nhiều lần, cơ chất được bổ sung vào, phản ứng với HRP và phát sáng, kết quả sẽ làm cháy phim, lúc này, các vạch protein sẽ hiện lên.

3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1 Cấu trúc plasmid pET28a-eltB-estB

Gene *estB* được thu nhận từ bộ gene của chủng ETEC bằng phương pháp PCR với mỗi đặc hiệu, đi kèm là mẫu đối chứng có thành phần tương tự nhưng không thêm khuôn. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho một vạch duy nhất phù hợp với kích thước theo thiết kế ban đầu là 160 bp. Ở mẫu đối chứng không xuất hiện vạch tương tự chứng tỏ đã không có hiện tượng ngoại nhiễm trong phản ứng PCR. Sản phẩm của phản ứng PCR tiếp tục được tinh sạch và xử lý với hai enzyme cắt giới hạn *HindIII* và *XhoI* để tạo đầu dính. Vì đoạn cắt ở hai đầu gene *estB* có kích thước vài nucleotide nên chênh lệch kích thước giữa gene *estB* trước và sau khi xử lý không thể hiện rõ

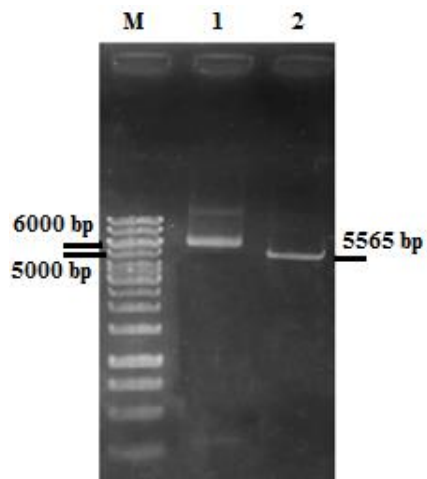
trong kết quả điện di (Hình 2). Vậy gene *estB* đã được thu nhận và xử lý tạo đầu dính thành công bằng enzyme cắt giới hạn *HindIII* và *XhoI*.



Hình 2: Kết quả thu nhận gene *estB* và xử lý với enzyme cắt giới hạn *XhoI* và *HindIII*

M, thang phân tử lượng; 1, sản phẩm PCR không thêm khuôn bộ gene; 2, sản phẩm PCR thu nhận gene *estB*; 3, sản phẩm PCR thu nhận gene *estB* xử lý với *XhoI* và *HindIII*

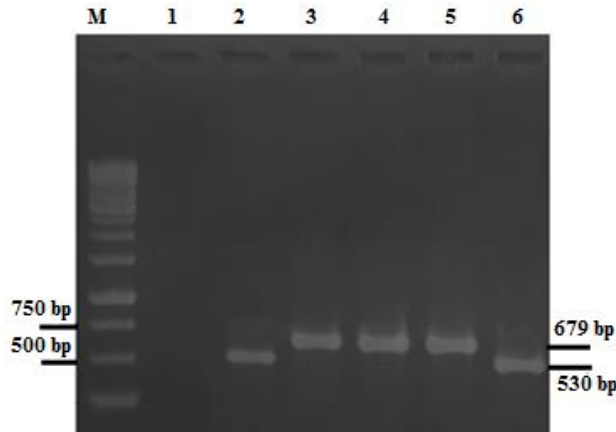
Plasmid pET28a-*eltB* (5580 bp) sau khi tách chiết tiếp tục được cắt mở vòng bằng hai enzyme cắt giới hạn *HindIII* và *XhoI* để tạo đầu dính tương ứng trên gene *estB*. Sản phẩm cắt hai đoạn DNA có kích thước 5565 bp và 15 bp, nhưng do đoạn 15 bp có kích thước nhỏ có thể đã di chuyển khỏi bàn gel trong quá trình điện di (Hình 3).



Hình 3: Kết quả thu nhận plasmid pET28a-*eltB* và xử lý với enzyme cắt giới hạn *XhoI* và *HindIII*
M, thang phân tử lượng; 1, plasmid pET28a-*eltB*; 2, plasmid pET28a-*eltB* xử lý với *XhoI* và *HindIII*

Sau khi xử lý với enzyme cắt giới hạn, gene *estB* được nối vào plasmid pET28a-*eltB* bằng enzyme T4 ligase. Sản phẩm nối được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5α và trải lên môi trường LB kanamycin. Bốn khuẩn lạc được lựa chọn một cách ngẫu nhiên để sàng lọc bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với môi T7pro và T7ter. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy ở mẫu đối chứng với khuôn là dịch vi khuẩn *E. coli* DH5α khả nạp (Hình 4, giếng 1) không cho bất kỳ sản phẩm nào. Đồng thời, các khuẩn lạc dự tuyển ở giếng 3, 4, 5 xuất hiện vạch DNA nằm trong khoảng 500-700 bp và cao hơn so với vạch DNA mẫu đối chứng ở giếng 2 (Hình 4). Sự chênh lệch

kích thước này là do gene *estB* có kích thước 160 bp nên khi gene *estB* được chèn vào, sản phẩm PCR với môi T7pro/T7ter sẽ cho sản phẩm có kích thước lớn hơn sản phẩm PCR của plasmid pET-*eltB*. Vậy nên, sản phẩm PCR thu được ở các giếng 3, 4, 5 phù hợp với thiết kế ban đầu. Riêng ở giếng 6 xuất hiện vạch DNA ngang với mẫu đối chứng có khuôn là plasmid pET28a-*eltB* (Hình 4, giếng 2). Điều này có thể giải thích là khuẩn lạc này mang plasmid pET28a-*eltB*. Như vậy, qua bước đầu sàng lọc khuẩn lạc bằng phương pháp PCR với môi T7pro/T7ter, dòng *E. coli* DH5α có khả năng mang plasmid tái tổ hợp pET28a-*eltB-estB* đã được thu nhận.



Hình 4: Kết quả sàng lọc dòng vi khuẩn *E. coli* DH5α mang plasmid tái tổ hợp pET28a-*eltB-estB* bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp môi T7pro/T7ter

M, thang phân tử lượng; 1, sản phẩm PCR *E. coli* DH5α khả nạp; 2, sản phẩm PCR plasmid pET28a-*eltB*; 3-6, các khuẩn lạc dự tuyển.

Plasmid từ dòng *E. coli* DH5α có khả năng mang plasmid tái tổ hợp pET28a-*eltB-estB* được tách chiết và giải trình tự để xác nhận trình tự. Kết quả giải trình tự cho thấy đã tạo thành công plasmid

pET28a-*eltB-estB*, gene dung hợp *eltB-estB* đồng khung dịch mã, được kiểm soát bởi T7 promoter và có trình tự tương đồng 100% so với trình tự thiết kế (Hình 5).

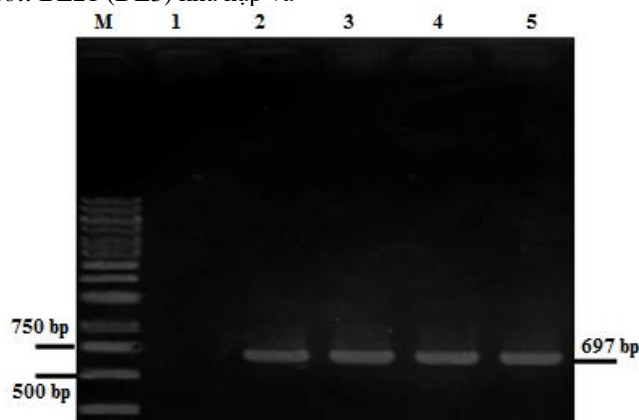
LTB-linker-S Clone 6	1	11	21	31	41	51	61	71
Consensus	ATGGCTCCCAGACTATTACAGAACTATGTTCCGAATATCGCAACACACAAAATATACAGATAAATGACAGATATCTATC							
LTB-linker-S Clone 6	81	91	101	111	121	131	141	151
Consensus	ATATACGGAAATCGATGGCAGGCAAAAGAGAAATGGTTATCATTAATTAAGAGCCGGCGAAACATTCAGGTCGAAGTCC							
LTB-linker-S Clone 6	161	171	181	191	201	211	221	231
Consensus	ATATACGGAAATCGATGGCAGGCAAAAGAGAAATGGTTATCATTAATTAAGAGCCGGCGAAACATTCAGGTCGAAGTCC							
LTB-linker-S Clone 6	241	251	261	271	281	291	301	311
Consensus	CGGGCAGTCAACATATAGACTCCAGAAAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATCTGACCGAG							
LTB-linker-S Clone 6	321	331	341	351	361	371	381	391
Consensus	CGGGCAGTCAACATATAGACTCCAGAAAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATCTGACCGAG							
LTB-linker-S Clone 6	401	411	421	431	441	451	461	471
Consensus	CGGGCAGTCAACATATAGACTCCAGAAAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATCTGACCGAG							
LTB-linker-S Clone 6	481	491	501	511	521	531	541	551
Consensus	CGGGCAGTCAACATATAGACTCCAGAAAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATCTGACCGAG							
LTB-linker-S Clone 6	GCTGGATGTTAT							
Consensus	gctggatgttat							

Hình 5: Kết quả giải trình tự plasmid pET-*eltB-estB*

3.2 Biểu hiện protein dung hợp LTB – STb

Plasmid pET28a-*eltB-estB* được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 (DE3), sau đó trải trên môi trường LB kanamycin. Ba khuẩn lạc được lựa chọn ngẫu nhiên để sàng lọc bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với môi T7pro và T7ter. Thí nghiệm sử dụng hai mẫu chứng là tế bào *E. coli* BL21 (DE3) khả nạp và

plasmid pET28a-*eltB-estB*. Kết quả sàng lọc (Hình 6) cho thấy cả ba khuẩn lạc đều xuất hiện vạch cùng kích thước với mẫu đối chứng là plasmid pET28a-*eltB-estB*. Mẫu đối chứng *E. coli* BL21 (DE3) khả nạp không xuất hiện bất kỳ vạch sản phẩm nào. Vậy nên, dòng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-*eltB-estB* đã được thu nhận thành công.



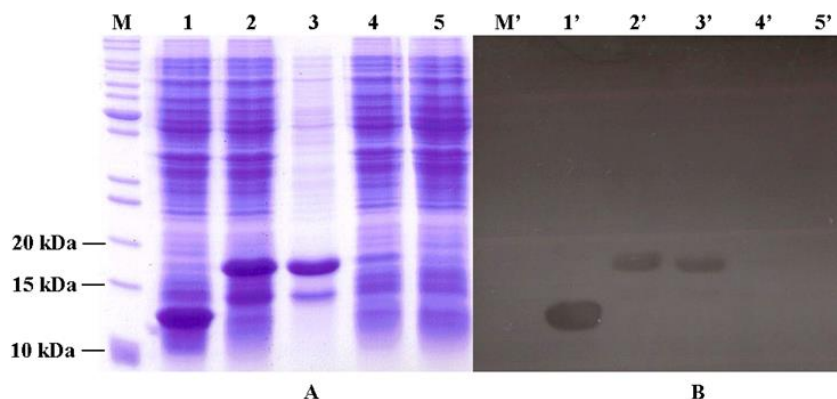
Hình 6: Kết quả sàng lọc *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid pET28a-*eltB-estB* bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp môi T7pro/T7ter

M, thang phân tử lượng; 1, sản phẩm PCR chủng *E. coli* BL21 (DE3) khả nạp; 2, sản phẩm PCR plasmid pET28a-*eltB-estB*; 3-5, các khuẩn lạc dự tuyển.

Sự biểu hiện vượt mức (vạch protein đậm hơn nhiều lần so với đối chứng) của protein LTB-STb ở các pha tổng (dịch phá tế bào), tủa (thu được sau khi ly tâm dịch phá tế bào), tan (dịch nổi thu được sau khi ly tâm dịch phá tế bào) của chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-*eltB-estB* được kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS - PAGE. Chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-*eltB* dùng để biểu hiện protein LTB được sử dụng làm mẫu đối chứng. Kết quả biểu hiện cho thấy cả hai chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-*eltB* (Hình 7, giếng 1) và *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-*eltB-estB* (Hình 7, giếng 2) đều xuất hiện vạch biểu hiện vượt mức. Ở giếng 1 (Hình 7, giếng 1 - mẫu biểu hiện của LTB), vạch biểu hiện với kích thước nằm giữa khoảng từ 14 và 20 kDa cao hơn kích thước theo thiết kế của LTB là 12,5 kDa. Đồng thời, ở giếng 2 (Hình 7, giếng 2), vạch biểu hiện vượt mức cũng nằm giữa khoảng 14 kDa và 20 kDa và cao hơn vạch biểu hiện

của LTB (Hình 7, giếng 1). Cả hai vạch đều nằm ở pha tủa (Hình 7, giếng 3). Theo kích thước thiết kế ban đầu, protein dung hợp LTB-STb có kích thước 18,1 kDa. Như vậy, cả hai vạch ở giếng 2 có kích thước lớn hơn 14,4 kDa đều có khả năng là vạch biểu hiện của LTB-STb.

Để xác nhận sự biểu hiện protein mục tiêu, chúng tôi tiến hành lai Western blot. Thí nghiệm lai Western blot được tiến hành với kháng thể kháng vùng 6xHis có trong trình tự acid amin của protein mục tiêu. Kết quả lai Western blot cho thấy các vạch biểu hiện vượt mức ở giếng 1-3 (Hình 7, giếng 1'-3') đều mang đuôi His. Như vậy, kết quả cho thấy vạch protein biểu hiện vượt mức là vạch biểu hiện của protein dung hợp LTB-STb do có sự chênh lệch kích thước so với mẫu biểu hiện của LTB, đồng thời phù hợp với khoảng kích thước dự đoán nằm giữa 15 và 20 kDa.



Hình 7: Kết quả kiểm tra biểu hiện protein bằng kỹ thuật SDS-PAGE (A) và Western blot (B)

M, thang phân tử lượng; 1, protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-eltB; 2-4, protein tương ứng pha tổng, tua và tan từ *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-eltB-estB; 5 protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-eltB-estB không cảm ứng với IPTG.

4 KẾT LUẬN

Đề tăng tính sinh miễn dịch cho protein STb và hướng tới việc phát triển vaccine đa giá phòng chống ETEC gây bệnh tiêu chảy trên heo con, mục tiêu nghiên cứu là dung hợp độc tố STb được với tiểu phần B của độc tố LT. Nghiên cứu này đã đạt được một số kết quả quan trọng sau: plasmid tái tổ hợp pET28a-eltB-estB được dòng hóa thành công, đồng thời, biểu hiện được protein LTB-STb có đuôi dung hợp 6xHis ở pha tua (dạng thể vùi), tại nồng độ cảm ứng IPTG 0,5 mM, trong 4 giờ tại nhiệt độ 37°C.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành đến PGS. TS. Nguyễn Viết Không, Viện Thú y Trung ương đã cung cấp chủng ETEC cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lý Thị Liên Khai, Nguyễn Thị Hạnh Chi và Nguyễn Thanh Lâm, 2015. Khảo sát tỷ lệ nhiễm và xác định gene kháng kháng sinh của Enterotoxigenic *Escherichia coli* trên heo con tiêu chảy tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học. 39: 7-17.

Lâm Thị Thu Hương và Đường Chi Mai, 2011. Tỷ lệ nhiễm rotavirus và *Escherichia coli* k88 trên heo con tiêu chảy. Khoa học Kỹ thuật Thú y. 6: 31-35

Nguyễn Thị Hạnh Chi, Lý Thị Liên Khai, Hà Thanh Toàn, 2014. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học. 33: 68-77.

Holland, R. E., 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical microbiology reviews*. 3(4): 345-375.

Morin, M., Turgeon, D., Jolette, J. *et al.*, 1983. Neonatal diarrhea of pigs in Quebec: infectious causes of significant outbreaks. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 47(1): 11-17.

Wieler, L., Ilieff, A., Herbst, W. *et al.*, 2001. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 48(2): 151-159.

Katsuda, K., Kohmoto M., Kawashima, K., and Tsunemitsu, H., 2006. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 18(4): 350-354.

Zhang, W., 2014. Progress and challenges in vaccine development against Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) associated porcine postweaning diarrhoea (PWD). *Journal of Veterinary Medicine and Research*. 1(2): 1006.

Dubreuil, J. D., Letellier, A., and Harel, J., A recombinant, 1996. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) fusion protein eliciting neutralizing antibodies. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 13(4): 317-323.

Da Hora, V. P., Conceição, F. R., Dellagostin, O. A. *et al.*, 2011. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. *Vaccine*. 29(8): 1538-1544.

Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, J. G., and Thoen, C. O., 2011. Pathogenesis of bacterial infections in animals: John Wiley & Sons, Forth Edition. Wiley-Blackwell, 664 pages.

Dubreuil, J. D., 2008. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. *FEMS microbiology letters*, 278(2): 137-145.